大麦糠プロアントシアニジンの抗酸化性

玉川浩司*・飯塚崇史*・池田彰男*・小池 肇*
長沼慶太*・小宮山美弘**Antioxidative Activity of Proanthocyanidins
Isolated from Barley BranKoji TAMAGAWA*, Satoshi IIZUKA**, Akio IKEDA*,
Hazime KOIKE*, Keita NAGANUMA*
and Yoshihiro KOMIYAMA*** Research and Development Center, Hakubaku Co.,
Ltd., 3492 Aoyagi, Masuho-cho, Yamanashi, 400-0501** The Yamanashi Industrial Technology Center, 2517,
Katsunuma, Katsunuma-cho, Yamanashi, 409-1316

Antioxidative activity of proanthocyanidins (dimer and trimer) isolated from barley bran were compared with catechins on inhibition of *in vitro* lipid peroxidation by the erythrocyte membrane ghost, microsomal and low density lipoprotein (LDL) systems. Inhibition to lipid peroxidation induced by *t*-butylhydroperoxide on the erythrocyte membrane ghost system of prodelphinidins was found to be higher than that of procyanidins, almost the same as that of (–)-epicatechin gallate ((–)-ECG) and (–)-epigallocatechin gallate ((–)-EGCG). These results had the same tendency as the inhibition to NADPH-dependent microsomal lipid peroxidation of proanthocyanidins. But inhibition of proanthocyanidins and catechins to Cu²⁺-induced LDL oxidation was different from that to lipid peroxidation on the erythrocyte membrane ghost and microsomal systems. Anyway these results suggested that prodelphinidins isolated from barley bran showed the same or more effectiveness to antioxidative activities than catechins.

(Received Aug. 18, 1998 ; Accepted Oct. 15, 1998)

これまで著者らは、食用大麦を製造する際、大量に発生する大麦糠中のポリフェノール成分に着目し、そこから抽出した大麦ポリフェノール抽出物 (BPE) がリノー

ル酸の自動酸化を抑制し、スーパーオキシドを捕捉する作用があることを報告した¹⁾。また、その抽出物のポリフェノールの主成分であるプロデルフィニン 2 量体及び 3 量体がラジカル捕捉活性及びサルモネラ法を用いた抗変異原性において優れた作用を保持していることを明らかにしてきた²⁾。

近年、生体内において脂質の酸化により生成する過酸化脂質が、細胞の機能低下や動脈硬化、肝疾患や網膜症などの病因として、またプロスタグランジン生成や薬物代謝、さらにはガンの発生や老化にも関与しているものと考えられている³⁾。従って、食品成分として摂取した抗酸化成分が生体中の脂質にどのように作用しうののかの評価が非常に重要となる。そこで、著者らは幾つかの *in vitro* の生体モデル系において、大麦糠より分離したプロアントシアニジンの抗酸化性をプロアントシアニジンの基本骨格であるカテキンの効果と比較検討した。

1. 実験方法

(1) 大麦糠からのプロアントシアニジンの抽出及び分離

プロアントシアニジンは、大麦ポリフェノール抽出物 (BPE) 1.0 g より既報²⁾と同様に抽出後、溶出、分離した。すなわち、メタノールで平衡化した Sephadex LH-20 (ファルマシア社製) カラム (920×30 mm I.D.) に、大麦ポリフェノール抽出物を吸着させ、メタノールにて流量 1.5 ml/min の条件で溶離し、溶出液の 280 nm の吸光度を測定した。各プロアントシアニジンの精製は ODS-3 (GL サイエンス社製, 250×20 mm I.D.) 分取用カラムを用い、脱イオン水とメタノール (共に 0.2% ギ酸含有) の直線的な濃度勾配により溶出、分離した。精製後の各プロアントシアニジンの純化程度は、ODS-80 Ts (TOSO 社製, 250×4.0 mm I.D.) 分析用カラムで調べた。また、LC-MS (M-1200 AP, 日立製作所社製) により分子量を確認した。分離精製したプロアントシアニジンの化学構造を Fig. 1 に示した。尚、プロアントシアニジンと機能性を比較したカテキンは、市販試薬 (シグマ社製) を供試した。

(2) ウサギ赤血球膜ゴースト系を用いた抗酸化試験

赤血球膜ゴーストの調製及び測定法は、大沢らの方法⁴⁾に準じた。すなわち、ウサギ保存血液 ((株)日本生物材料センター社製) 100 ml に等張液 (10 mM リン酸緩衝液 (160 mM NaCl 含有, pH 7.4)) 100 ml を加え、よく浸透した後、1500×g で 4℃、20 分間遠心分離を行

* (株)はくばく研究開発センター(〒400-0501 山梨県南巨摩郡増穂町最勝寺3492)

** 山梨県工業技術センター(〒409-1316 山梨県東山梨郡勝沼町勝沼2517)

Fig. 1 Structures of proanthocyanidins isolated from barley bran

い上清を除いた。この操作を3回繰り返す、得られた赤血球に低張液 (10 mM リン酸緩衝液, pH 7.4) 100 ml を加え、振とうした後、20 000×g, 4°C で40分間遠心分離を行い、上清を除き、赤血球膜ゴーストを得た。次に、DC プロテインアッセイキット (パイオラッド社製) を用いて、3 mg/ml の蛋白濃度に調製した赤血球膜ゴースト 0.85 ml をキャップ付きスクリー管に入れ、24 mM *t*-ブチルヒドロペルオキシド (*t*-BuOOH, シグマ社製) 水溶液 0.05 ml を加えた。更にジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶かしたプロアントシアニン及びカテキン溶液 (最終反応液濃度で 200 μ M となるように調整) 0.05 ml を入れ、攪拌後、37°C で30分間インキュベートした。反応終了後、ただちに氷冷し、TBA 法⁵⁾により測定した。

尚、酸化抑制能の検定は抗酸化物質を加えなかったものを対照として、535 nm における対照の吸光度を 100 とする%で示した。

(3) ラット肝ミクロソームを用いた抗酸化試験

測定方法については、SHIRAKI らの方法⁶⁾に準じた。すなわち、ラット肝ミクロソーム (ラット肝臓 S-9, アロクロル 1254 産生, ICN 社製) に 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) を加え、蛋白濃度を 1.5 mg/ml に調整した懸濁液 0.5 ml をキャップ付きスクリー管に入れ、DMSO に溶かしたプロアントシアニン及びカテキン溶液 (最終反応液濃度で 0.5 μ M~4.0 μ M となるように調整) 0.025 ml, 20 mM ADP (オリエンタル酵母社製) 0.5 ml, Fe (III)-EDTA ((株)同仁化学研究所製) 0.5 ml, 1 mM NADPH (オリエンタル酵母社製) 0.5 ml を

加えて攪拌した。この反応液を 37°C の湯浴中で 30 分間インキュベートした後、ただちに氷冷し、TBA 法⁵⁾により測定した。

(4) Low density lipoprotein (LDL) を用いた抗酸化試験

測定方法については、OHTA らの方法⁷⁾に準じた。すなわち、試験管に 10 mM リン酸緩衝液 (160 mM NaCl 含有, pH 7.4) に溶かしたプロアントシアニン及びカテキン溶液 (最終反応液濃度で 1 μ M となるように調整) 1 600 μ l を入れ、LDL (from human plasma, シグマ社製) 30 μ l (最終反応液濃度で 100 μ g protein/ml となるように添加), CuSO₄ 溶液 (最終反応液濃度で 20 μ M となるように調整) 370 μ l を加え、攪拌し、37°C 下で 234 nm の吸光度 (共役ジエン量の増加) を 15 分間隔で経時的に測定した。

尚、LDL の酸化抑制能の検定は、234 nm の吸光度で 15 分間に 0.05 以上の上昇が認められるまでの経過時間を Lag-time として評価した。

2. 実験結果及び考察

(1) プロアントシアニン及びカテキンのウサギ赤血球膜ゴーストの酸化抑制能

大麦糠より分離したプロアントシアニンでは、プロデルフィニジン、即ち、プロデルフィニジン T1, T2, T3, 及び B3 がプロシアニン B3 及び T4 より赤血球膜ゴーストの酸化抑制能が大きく、*t*-BuOOH による過酸化率を 47~54% に抑制した。また、その効果は、(-)-エピカテキンガレート ((-)-ECG) 及び (-)-エピガロカテキンガレート ((-)-EGCG) に匹敵した。プロシアニン B-3 及び T4 の赤血球膜ゴーストの酸化抑制能は、(+)-カテキン ((+)-C), (-)-エピカテキン ((-)-EC) 及び (-)-エピガロカテキン ((-)-EGC) とはほぼ同等であり、その過酸化率は 63~67% であった (Fig. 2)。

著者らは、先にプロアントシアニジンのスーパーオキシド及び DPPH ラジカルに対する捕捉能を検討し、プロデルフィニジンがプロシアニンと比較しその作用が大きいことを報告しており²⁾、今回の結果とよく一致していた。しかし、カテキンについては、これまで、比較的ラジカル捕捉能が大きかった (-)-EGC における赤血球膜ゴーストの酸化抑制能は小さかった。NAMIKI らは、既に赤血球膜ゴーストの脂質酸化に対するカテキンの抑制効果を検討しており、(-)-ECG 及び (-)-EGCG が他のカテキンと比較し、その効果が大きいと報告している⁸⁾。ZHANG らは、*in vitro* でカテキン類の

Fig. 2 Inhibition of proanthocyanidins and catechins to *in vitro* lipid peroxidation by the rabbit erythrocyte ghost system

Peroxidation of erythrocyte ghosts was induced by *t*-butylhydroperoxide. The final concentration of natural antioxidant was 200 μ M. The values obtained without antioxidants were used for 100% lipid peroxidation.

Measurement was in triplicated. Means and SD are indicated.

AAPH (2,2-アゾ-ビス (2-アミジノプロパン) ジハイドロクロライド) ラジカルで誘発した赤血球膜の脂質酸化に対する抑制効果において, (-)-EGCG 及び (-)-ECG が, (-)-EGC 及び (-)-EC と比較し, 大きいと報告している⁹⁾. また, HONG らは, FeSO_4 で誘発したラット心臓ミトコンドリアの脂質酸化に対するカテキンの抑制効果において, ECG, EGCG 及び GCG が, 他のカテキン類と比較し大きく, その要因は 3-0-位のガロイル基にあると考察している¹⁰⁾. 従って, 今回のウサギ赤血球膜ゴーストの脂質酸化系の場合においても, 没食子酸エステルの部位が酸化抑制能の大きさに関与しているものと考えられた. 以上の結果より, 大麦糠由来のプロデルフィニジンは赤血球膜ゴーストの脂質酸化に対しても強い抑制能を保持していることがわかった.

(2) プロアントシアニン及びカテキン類のラット肝臓ミクロソームの酸化抑制能

プロアントシアニンにおいては, 赤血球膜ゴーストの脂質酸化に対する抑制能の結果と同様に, プロデルフィニジンがプロシアニンと比較し, ラット肝臓ミクロソームの脂質酸化に対する抑制能が大きい傾向を示した (Fig. 3). プロデルフィニジン T1 の酸化抑制能が最も大きく, その効果は IC_{50} (酸化を 50% 抑制する濃度) で 0.7 μ M であった. 次に, プロデルフィニジン T2 及び T3 が大きく, その IC_{50} 値は約 1.0 μ M であった. また, この値は (-)-ECG 及び (-)-EGCG に匹敵した.

Fig. 3 Inhibition of proanthocyanidins and catechins to *in vitro* lipid peroxidation by the rat liver microsomal system

The $\text{ADP-Fe}^{3+}/\text{EDTA-Fe}^{3+}/\text{NADPH}$ system was employed. Four different concentration of natural antioxidant were prepared. The values are lead from two experiments. The values obtained without natural antioxidants were used as 100% lipid peroxidation.

○, Procyanidin B3; ●, Procyanidin T4; △, Prodelphinidin B3; ▲, Prodelphinidin T1; ■, Prodelphinidin T2; □, Prodelphinidin T3; ■, (-)-Epicatechin; ▲, (+)-Catechin; ●, (-)-Epigallocatechin; ○, (-)-Epicatechin gallate; □ (-)-Epigallocatechin gallate

プロデルフィニジン B3 の IC_{50} 値はプロシアニン T4 と比較し, やや大きく, プロシアニン B3 と比較して, かなり大きかった. 一方, (-)-EC 及び (+)-C は他の成分と比較し, その作用は小さかった.

KATYAR らは, $\text{Fe}^{3+}/\text{ADP}$ 系の存在下におけるマウス表皮のミクロソームの脂質酸化に対して, (-)-EGCG, (-)-ECG, 及び (-)-EGC が (-)-EC と比較し, 明らかにその抑制能が大きいことを報告している¹¹⁾. また, NAMIKI らは, 既に著者らと同系の脂質酸化システムにおけるカテキンの効果について, 同様の結果を報告している⁹⁾.

以上の結果より, 大麦糠由来のプロデルフィニジンがミクロソームの脂質酸化に対しても, カテキンと比較し, 同等あるいはそれ以上の抑制能を保持していること

がわかった。

(3) プロアントシアニン及びカテキンの LDL の酸化抑制能

実験結果を Fig. 4 に示した。プロアントシアニンにおいては、プロデルフィニン T 2 が LDL の酸化による共役ジエン生成の Lag-time が最も大きく、その値は 330 分であった。次いでプロシアニン T 4 (Lag-time 285 分)、プロデルフィニン T 1 (Lag-time 270 分)、プロデルフィニン T 3 (Lag-time 240 分)、プロシアニン B 3 (Lag-time 210 分)、プロデルフィニン B 3 (Lag-time 135 分) の順であった。カテキンにおいては、(-)-ECG が Lag-time 195 分と最も長く、次いで (+)-C (Lag-time 90 分)、(-)-EGCG (Lag-time 60 分)、(-)-EC (Lag-time 30 分) であった。(-)-EGC の Lag-time は、コントロール (抗酸化成分無添加区) とほとんど変わらなかった。これらの結果はいままでの抗酸化に関するプロアントシアニン及びカテキンにおけるラジカル消去能²⁾、ウサギ赤血球膜ゴースト及びラット肝臓ミクロソームの酸化抑制能の結果とかなり異なっていた。すなわち、化学構造の違いによる LDL 酸化抑制能の傾向が異なっていたことである。YAMANAKA らは Cu^{2+} が触媒された LDL の酸化に対し、Propagation phase (反応連鎖の段階) では、カテキンが酸化を促進する作用があると報告している¹²⁾。また、

Fig. 4 Inhibition of proanthocyanidins and catechins to *in vitro* low density lipoprotein oxidation

LDL (100 μg protein/ml) was incubated with 20 μM CuSO_4 at 37°C in presence or absence of 1.0 μM proanthocyanidins or catechins. Conjugated diene formation was measured by determining the absorbance at 234 nm every 15 min for 7 h.

Symbols except control (Δ) are the same as those in Fig. 3.

HAYAKAWA らは Cu^{2+} の存在下でカテキンがリノール酸の酸化を誘導することを報告している¹³⁾。今回の実験においても、カテキンだけではなく、プロアントシアニンにおいても LDL の酸化を抑制する一方で、酸化を誘導しているかもしれない。

これらのことより、生体モデル系での遷移金属イオン、酸化還元電位に関わる酵素群、基質等の種類及び濃度等の環境因子により、酸化抑制の作用が異なることが考えられた。しかしながら、大麦糠より抽出した BPE 中の主成分であるプロデルフィニンは、生体内においても、カテキンと、同等あるいはそれ以上の抗酸化能を保持するものと考えられ、有効利用の可能性が示唆された。

3. 要 約

大麦糠由来のプロアントシアニン (2 量体及び 3 量体) について、幾つかの生体モデル系における抗酸化性試験を行った。また、その作用をカテキンと比較した。

(1) プロアントシアニンの *t*-BuOOH によって誘導された赤血球膜ゴーストの脂質酸化に対する抑制能を測定した結果、その作用はプロデルフィニンがプロシアニンよりも大きい傾向を示した。また、その作用は (-)-ECG 及び (-)-EGCG に匹敵した。

(2) プロアントシアニンの酵素反応支配下におけるラット肝ミクロソームの脂質酸化に対する抑制能を測定した結果、赤血球膜ゴーストに対する抑制能の結果と同様にプロデルフィニンがプロシアニンと比較し、その作用が大きい傾向を示した。また、その作用は (-)-ECG 及び (-)-EGCG に匹敵した。

(3) プロアントシアニンの Cu^{2+} が触媒された LDL の酸化に対する抑制能を測定した結果、化学構造による酸化抑制能に傾向が見られなかったが、比較のカテキンよりその作用が大きいことがわかった。

参 考 文 献

- 1) 玉川浩司・飯塚崇史・福島 誠・遠藤好司・小宮山美弘：食科工，44，512 (1997)。
- 2) 玉川浩司・飯塚崇史・小堀真珠子・新本洋士・津志田藤二郎：食科工，45，420 (1998)。
- 3) 大沢俊彦：食品中の生体機能調節物質研究法，川岸舜朗編著，学会出版センター，P 7，(1996)。
- 4) OSAWA, T., IDE, A., SU, D.J. and NANIKI, M.: *J. Agric. Food. Chem.*, 35, 808 (1987)。
- 5) 松下雪郎：栄養と食糧，34，523 (1981)。
- 6) SHIRAKI, M., HARA, Y., OSAWA, T., KUMON, H., NAKAYAMA, T. and KAWAKISHI, T.: *Mutate. Res.*,

- 323, 29 (1994).
- 7) OHTA, T., SEMBOKU, N., KUCHII, A., EGASHIRA, Y. and SANADA, H. : *J. Agric. Food. Chem.*, **45**, 1644 (1997).
- 8) NAMIKI, M. and OSAWA, T. : *Basic Life Sci.*, **39**, 131 (1986).
- 9) ZHANG, A., ZHU, Q. Y., LUK, Y.S., HO, K.Y., FUNG, K. P. and CHEN, Z-Y. : *Life Sci.*, **61**, 383 (1997).
- 10) HONG, C.Y., WANG, C.P., LO, Y.C. and HSU, F.L. : *Am. J. Chin. Med.*, **22**, 285 (1994).
- 11) KATIIYAR, S.K., AGARWAL, R. and MUKHTAR, H. : *Cancer Lett.*, **79**, 61 (1994).
- 12) YAMANAKA, N., ODA, O. and NAGAO, S. : *FEBS Lett.*, **401**, 230 (1997).
- 13) HAYAKAWA, F., KIMURA, T., MAEDA, T., FUJITA, M., SOHMIYA, H., FUJII, M. and ANDO, T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1336**, 123 (1997).
- (平成 10 年 8 月 18 日受付, 平成 10 年 10 月 15 日受理)
-